

РАДЧЕНКО О. М.<sup>✉</sup>, САНДЕЦЬКА Н. В., ДИКУН М. О., СІРАНТ Л. В.

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

<sup>✉</sup> ales2009@ukr.net

## ПОЛІМОРФІЗМ ІЗОФЕРМЕНТІВ АЛЬФА-АМІЛАЗИ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

**Мета.** Вивчення поліморфізму альфа-амілази у сортів озимої м'якої пшениці. **Методи.** Ізоферменти  $\alpha$ -амілази виявляли за допомогою методу електрофоретичного розділення білків у поліакриламідному гелі. Визначали число падіння на приладі «Falling Number 1700». **Результати.** Досліджували сорти Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ, Селекційно-генетичного інституту НААН, м. Одеса та німецькі сорти. Виявлено поліморфізм альфа-амілази зерна пшениці за допомогою методу електрофоретичного розділення білків. Здійснено пошук асоціацій між варіантами альфа-амілази і стійкістю до передзбирального проростання зерна сортів м'якої пшениці та визначено число падіння у досліджуваних зразків. **Висновки.** Оцінено частоту поширення варіантів за ізоферментами альфа-амілази у сортів м'якої пшениці. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту AbC, відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання зерна. Серед досліджуваних сортів СГІ НААН та ІФРГ НАН України переважає варіант альфа-амілази AbC.

**Ключові слова:** альфа-амілаза, ізоферменти, м'яка пшениця, електрофорез, число падіння.

Серед білкових систем фермент  $\alpha$ -амілаза є однією з найбільш генетично поліморфних систем, відомих у пшениці. Її можна використовувати в селекційно-генетичних дослідженнях із метою ідентифікації сортів, для вивчення взаємозв'язку між алелями, які кодують амілазу, і за господарсько-цінними ознаками.

Фермент  $\alpha$ -амілаза контролюється двома серіями гомеологічних локусів, що знаходяться в 6 і 7 групах хромосом [1]. Згідно з міжнародною номенклатурою, запис  $\alpha$ -Amy-B1 позначає локус серії  $\alpha$ -Amy-1, локалізований у хромосомі 6B. Алелі певних локусів позначаються малими латинськими буквами. Наприклад,  $\alpha$ -Amy-B1b позначає певний алельний варіант локусу  $\alpha$ -Amy-B1 хромосоми 6B [2].

Опубліковано каталог алелів, що виявляються за допомогою методу ізоелектрофокусування ізозимів  $\alpha$ -амілази, а також список сортів, які мають ті чи інші алелі [3].

Ткачук [4] і Олеред [5] виділили два типи  $\alpha$ -амілаз у зерні пшениці. Один із типів ферменту, який присутній у пшеничному солоді і проростаючому зерні, вони назвали «солодовою» («malt»)  $\alpha$ -амілазою. Ферменти другого типу, активні в зерні, яке дозріває, назвали «зеленими» («green»)  $\alpha$ -амілазами. Між цими типами існують відмінності: «солодові» амілази більш термостабільні і високоефективні, а «зелені» швидше втрачають активність під час нагрівання і мають низьку гідролітичну здатність [6].

Фермент  $\alpha$ -амілаза зернівки пшениці, яка проростає, синтезується клітинами алейронового шару. Встановлено хромосомний контроль синтезу  $\alpha$ -амілази, проте наявні дані мають суперечливий характер, різними авторами вказується різна кількість локусів на одній хромосомі (наприклад, на хромосомі 6B), які кодують  $\alpha$ -амілазу.

Перші дослідження генетичного контролю ізоферментів  $\alpha$ -амілази пророщеної зернівки були виконані японськими вченими. Вони прийшли до висновку, що гени, які контролюють біосинтез ізоферментів  $\alpha$ -амілази, локалізовані в довгих плечах хромосом 6 і 7 гомеологічних груп [7, 8].

Фермент  $\alpha$ -амілази представлений трьома типами ізоферментів: GI і GII, які активні за формування і дозрівання зерна, і GIII активніші у проростаючому зерні. Ізоферменти GIII-амілази проростання (термостабільні, високоефективні ферменти) – отримали назву  $\alpha$ -AMY-1; вони є більш лужними і синтезуються через 48 годин після початку проростання. Ця група контролюється генами  $\alpha$ -Amy-A1,  $\alpha$ -Amy-B1 і  $\alpha$ -Amy-D1, локалізованими в хромосомах шостої гомеологічної групи 6A, 6B та 6D. Група ізоферментів GI-амілази дозрівання (термолабільна група ізоферментів, що має слабку гідролітичну здатність) названа  $\alpha$ -AMY-2; вони більш кислі,

утворюються на кілька днів пізніше, ніж  $\alpha$ -АМУ-1, і контролюються генами  $\alpha$ -Аму-А2,  $\alpha$ -Аму-В2 і  $\alpha$ -Аму-D2, локалізованими в хромосомах сьомої групи (7A, 7B та 7D) [9, 10]. GII-тип ізоферментів, які виникають у процесі розвитку зерна, контролюються генами, локалізованими в хромосомах сьомої групи.

Значна гетерогенність  $\alpha$ -амілази в зерні пшениці, що проростає, була встановлена методом електрофорезу. Є дві думки щодо природи компонентів  $\alpha$ -амілази зерна пшениці. Працюючи з великим набором різних генотипів злакових, одні автори вважають усі компоненти  $\alpha$ -амілази ізоферментами [7]. Інші ж автори [11], вивчаючи фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілази одного генотипу і не знайшовши достатньо чітких відмінностей між компонентами, висловлювали сумніви щодо їх ізоферментної природи. Ці протиріччя, можливо, спричинені використанням різних методів вивчення гетерогенності ферменту [12]. Т. Б. Дарканбаєвим із співавторами було запропоновано більш доступний і простий для масового аналізу метод електрофорезу в поліакриламідному гелі, який незначно поступається за розподільною здатністю ізоелектрофокусуванню [12].

Метою нашої роботи було вивчення поліморфізму ізоферментів альфа-амілази у досліджуваних сортів озимої м'якої пшениці та дослідження впливу варіантів альфа-амілази на стійкість до передзбирального проростання зерна.

### Матеріали і методи

У роботі було використано 44 зразки м'якої пшениці озимої. Зерно попередньо пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері в темноті за кімнатної температури протягом 4 діб. Перед пророщуванням зерно стерилізували в розчині  $\text{KMnO}_4$ , нагрівали до  $75^\circ\text{C}$  протягом 30 с промивали дистильованою водою [13, 14].

Для екстракції ферменту проросле зерно заливали 0,2 % розчином  $\text{CaCl}_2$ , який містить 30 % цукрози та бромфеноловий синій, кількість екстракційного буферу 1000 мкл. на зернівку. Після ретельного подрібнення кожної зернівки скляною паличкою, настоювали протягом години і центрифугували 4 хв. за 10000 об/хв.

Електрофорез проводили у пластинах 7,5 % поліакриламідного гелю [15]. Для звільнення від  $\beta$ -амілази в гель додавали 5М сечовину. Розділення ізоферментів проводили в трис-

гліциновому буфері рН 8,4 за сили струму 35 мА 4,5 години.

Інкубацію амілаз проводили в 1,5 % розчині гідролізованого крохмалю в ацетатному буфері рН 5,4, який доводили до кипіння та охолоджували. Гелі витримували у розчині крохмалю 1 годину. Потім промивали проточною водою і фарбували. Склад фарби: 0,5 гр. KI, 260 мг.  $\text{I}_2$ , 5 гр. трихлороцтової кислоти, вода до 100 мл.

Визначали число падіння на приладі «Falling Number 1700» [16]. Число падіння – це всевітньо признаний метод для визначення рівня активності альфа-амілази в зерні пшениці, вимірюється в секундах. Метод заснований на швидкій желатинізації суспензії шрота зерна в киплячій водянній бані і вимірюванні розчинення крохмалю за дії альфа-амілази, яка міститься в зразку. Число падіння є комплексною оцінкою, обернено пропорційною кількості альфа-амілази в зразку. Значення числа падіння нижче 150 сек. – висока активність амілази, зерно починає проростати, тоді як значення числа падіння більше 200–300 сек. – оптимальна активність амілази, пшениця високої якості. А більше 300 сек. – низька активність альфа-амілази, що свідчить про високу стійкість зерна до передзбирального проростання.

### Результати та обговорення

Ми вивчали ізоферментний склад альфа-амілази зерна у 44-х сортів озимої пшениці з різних селекційних центрів України (табл.). Досліджувані сорти були поділені на три групи: сорти Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ, сорти Селекційно-генетичного інституту НААН, м. Одеса та сорти німецької селекції.

Наявність у верхній частині електрофореграми одночасно трьох компонентів альфа-амілази свідчить про наявність у геномі трьох домінуючих алелів –  $\alpha$ -Аму-А1,  $\alpha$ -Аму-В1 та  $\alpha$ -Аму-D1, які контролюють ізоферменти (рис. 1, 2, 3). Варіанти ізоферментів в електрофоретичних зонах рухливості позначали буквами А, В, С. Для класифікації сортів за ізоферментами великими буквами позначали присутність компонента, а маленькими – відсутність активності у відповідній зоні зимограми.

Серед сортів ІФРГ НАН України переважав варіант альфа-амілази AbC (рис. 1, 2, 3). Поширеність цього варіанта складала 76,5 %. Серед одеських сортів також переважав варіант

AbC. Частота такого варіанта була 66,5 %.

З інших варіантів за альфа-амілазою можна виділити ABC, який був присутній у сортах селекції СГІ НААН та в сортах селекції ІФРГ НАН України – 22,5 % та 11,5 %. У сортах селекції ІФРГ НАН України також присутній варіант Abc – 12,0 %, а в одеських сортах у цій вибірці такий варіант був відсутній. Також у сортах селекції СГІ НААН присутній варіант ABC – 11,0 %, а в сортах селекції ІФРГ НАН України такий варіант відсутній. Німецькі сорти мали два варіанти за альфа-амілазою ABC та AbC. Така диференціація за поширеністю варіантів альфа-амілази, можливо, пов'язана з погодно-

кліматичними особливостями регіонів.

Серед представлених варіантів альфа-амілази можна виділити варіант ізоферментів із позначенням AbC, який переважав в обох селекційних центрах.

Нами був проведений пошук асоціацій між варіантами альфа-амілази та стійкістю до передзбирального проростання зерна. Було визначено число падіння у досліджуваних зразків. Усі зразки були розділені на 2 групи: стійкі та нестійкі. До нестійких відносяться зразки, які мають число падіння менше від 200 сек., а для зразків, які мають високу стійкість, характерне число падіння більше від 200 сек.

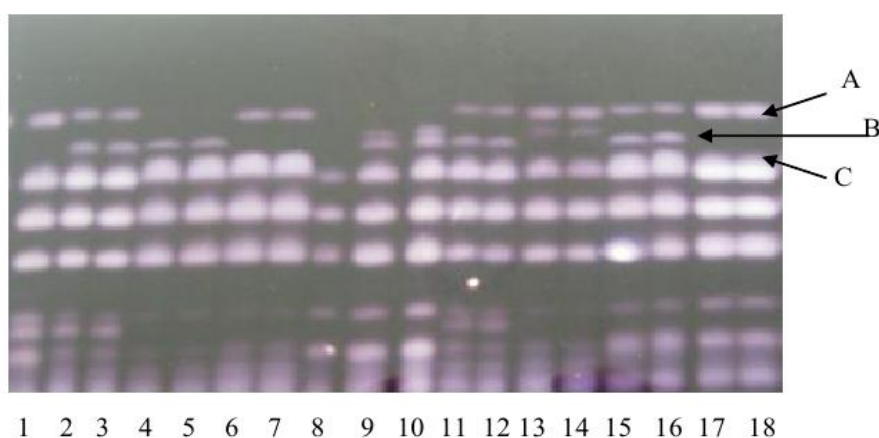


Рис. 1. Зимограми альфа-амілази сортів м'якої пшениці: буквами позначені протестовані варіанти. 1 – Даринка київська, 2, 3 – Хуртовина, 4, 5 – Золотоколоса, 6, 7 – Достаток, 8 – Наталка, 9, 10 – Дарунок поділля, 11, 12 – Спасівка, 13, 14 – Соломія, 15, 16 – Богдана, 17, 18 – Новокиївська.

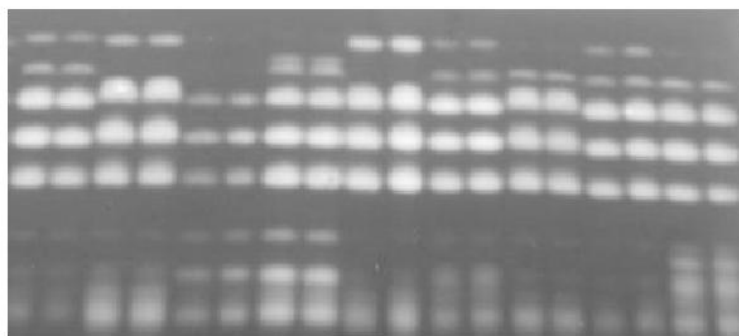
Таблиця. Варіанти ізоферментів альфа-амілази у досліджуваних сортів м'якої пшениці

Сорт	Число падіння	Походження	Варіанти ізоферментів		
			A	B	C
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Бунчук – червонозер.	380	СГІ НААН, Одеса	A	b	C
Куяльник – червонозер.	385	СГІ НААН, Одеса	A	b	C
Скаген – червонозер.	340	Німеччина	A	b	C
Астарт – червонозер.	399	ІФРГ НАН України	A	b	C
Білява – білозерн.	168,5	СГІ НААН, Одеса	A	B	C
Малинівка – червонозер.	441	ІФРГ НАН України	A	b	C
Кубус – червонозер.	180	Німеччина	A	B	C
Київська ост. – червонозер.	473	ІФРГ НАН України	A	b	C
Смуглянка – червонозер.	444,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	C
Достаток – червонозер.	406,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	c
Наталка – червонозер.	248	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	A	b	C

Продовження таблиці

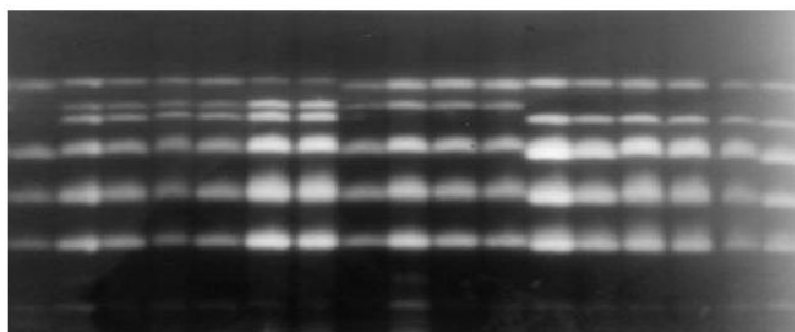
1	2	3	4	5	6
Альбатрос одес. – червонозер.	–*	СГІ НААН, Одеса	А	б	С
Дарунок Поділля – червонозер.	375	ІФРГ НАН України, ЗАТ "Зернопродукт МХП	А	В	С
Софійка – червонозер.	–*	СГІ НААН, Одеса	А	В	с
Ятрань 60 – червонозер.	204	ІФРГ НАН України	А	б	С
Чигиринка – червонозер.	182	ІФРГ НАН України,	А	б	С
Орійка – червонозер.	220	ІФРГ НАН України	А	б	С
Ласуня – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Солоха – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Лимарівна – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Почаївка – червонозер.	360,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Даринка Київська – червоноз.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	с
Хуртовина – червонозер.	175,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Золотоколоса – червонозер.	401,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Спасівка – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Соломія – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Богдана – червонозер.	255	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Новокиївська – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Подолянка – червонозер.	385	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Борія – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Сонечко – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
УК 254 – білозерн.	65	ІФРГ НАН України	А	В	С
УК 255 – білозерн.	70	ІФРГ НАН України	А	В	С
Оксана – червонозер.	94	СГІ НААН, Одеса	А	В	С
Панна – червонозер.	420	СГІ НААН, Одеса	А	б	С
Нива одеська – червонозер.	428	СГІ НААН, Одеса	А	б	С
Снігурка – червонозер.	365	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Каланча – червонозер.	316	ІФРГ НАН України	А	б	с
Володарка – червонозер.	93,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	с
Зимоярка – червонозер.	309,5	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Злука – червонозер.	365	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	В	С
Крижинка – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України, Мир. ін. пш. НААН	А	б	С
Новосмуглянка – червонозер.	–*	ІФРГ НАН України	А	б	С
Чорноброва – чорнозер.	287,5	СГІ НААН, Одеса	А	б	С

Примітка. \*– Показники, помічені зірочкою, в окреслених зразках не визначалися.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Рис. 2. Зимограми альфа-амілази сортів м'якої пшениці: буквами позначені протестовані варіанти. 1, 2 – Чигиринка, 3, 4 – Достаток, 5, 6 – Наталка, 7, 8 – Дарунок Поділля, 9, 10 – Орійка, 11, 12 – Ласуня, 13, 14 – Солюха, 15, 16 – Лимарівна 17, 18 – Почаївка.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Рис. 3. Зимограми альфа-амілази сортів м'якої пшениці. 1 – Даринка київська, 2, 3 – Ук 254, 4, 5 – Ук 255, 6, 7 – Оксана, 8, 9 – Панна, 10, 11 – Нива одеська, 12, 13 – Подолянка, 14, 15 – Снігурка, 16, 17 – Перлина Лісостепу.

Усі зразки були розділені на дві групи: білозерні та червонозерні. В обох групах визначали число падіння. В групі білозерних пшениць середній показник числа падіння становив 101 сек., а в групі червонозерних пшениць середній показник числа падіння – 316 сек. Варіант альфа-амілаз АВС присутній у білозерних пшениць, тоді як у червонозерних пшениць виявлені такі варіанти альфа-амілаз: АbС, АbС, АbС та Аbс. Таким чином, можна зробити висновок, що червонозерні пшениці мають більшу стійкість до передзбирального проростання, ніж білозерні. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту АbС, відрізняються меншою стійкістю до передзбирального проростання.

Серед зразків із варіантом альфа-амілази АbС середнє значення числа падіння було 340 сек., тоді як із варіантом альфа-амілази АbС середнє значення числа падіння становило 180 сек. А серед сортозразків із варіантом альфа-

амілази Аbс середнє значення числа падіння дорівнювало 200 сек.

### Висновки

Виявлений поліморфізм ізоферментів альфа-амілази зерна пшениці за допомогою методу електрофоретичного розділення білків. Була оцінена частота поширеності варіантів за ізоферментами альфа-амілази у сортів м'якої пшениці. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту АbС, відрізняються більшою стійкістю до передзбирального проростання. Серед досліджуваних сортів СГІ НААН та ІФРГ НАН України переважає варіант альфа-амілази АbС. Червонозерні пшениці мають більшу стійкість до передзбирального проростання, ніж білозерні. Показано, що генотипи, які містять варіант ізоферменту АbС, відрізняються меншою стійкістю до передзбирального проростання.

## References

1. Gale M.D., Law C.N., Chojecky A. Genetic control of  $\alpha$ -amylase production in wheat. *Theor. and Appl. Genet.* 1983. Vol. 64, № 4. P. 309–316.
2. Illichevsky N.N. Kudryavtsev A.M., Upelnik V.P., Metakovsky E.V. Analysis of pedigree varieties of bread wheat based on the study of  $\alpha$ -amylase polymorphism. *Genetics*. 1995. Vol. 31, No. 12. P. 1650–1654. [in Russian] / Илличевский Н.Н., Кудрявцев А.М., Упелник В.П., Метакровский Е.В. Анализ родословных сортов мягкой пшеницы на основе изучения полиморфизма  $\alpha$ -амилазы. *Генетика*. 1995. Т. 31, № 12. С. 1650–1654.
3. Ainsworth C., Doherty P., Edwards K. Alelic variation of  $\alpha$ -amylase loci in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1985. Vol. 70, № 4. P. 400–406.
4. Tkachuk R., Kruger J. Wheat alpha-amylases. II. Physical characterization. *Cereal Chem.* 1974. Vol. 51. P. 508–529.
5. Olered R.L.  $\alpha$ -Amylase isozymes in cereal sand their influence on starch properties. *Cereal Res. Commun.* 1976. Vol. 4, № 2. P. 195–201.
6. Lunn G.D., Major B. J., Kettlewell P. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*) grain in the U.K. *Cereal Sci.* 2001. Vol. 33. P. 313–329.
7. Nishikawa K., Furuta Y., Hina Y. Genetic studies of  $\alpha$ -amylase isozymes in wheat. I. Genetic analysis in hexaploid wheat. *Japan J. Genet.* 1981. Vol. 56, № 4. P. 385–395.
8. Mrva K., Mares D. Regulation of high pI alpha-amylase synthesis in wheat aleurone by a gene(s) located on chromosome 6B. *Euphytica*. 1999. Vol. 109. P. 17–23.
9. Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum*) grain in the U.K. *J. Cereal Sci.* 2001. Vol. 33. P. 313–329.
10. Mamytova N.S., Kuzovlev V.A., Khakimzhanov A.A. The contribution of different  $\alpha$ -amylase isoenzymes of the commodity grain spring wheat in the formation of falling number values. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. Vol. 50, № 5. P. 531–537.
11. Silvanovich M.P., Hill R.D. *Cereal Chem.* 1977. Vol. 54. P. 1270.
12. Darkanbaev T.B., Fursov O.V., Khaidarova Zh.S. Grain  $\alpha$ -amylase isoenzymes of some cereals. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 1980. Vol. 12, No. 3. P. 258–262. [in Russian] / Дарканбаев Т.Б., Фурсов О.В., Хайдарова Ж.С. Изоферменты  $\alpha$ -амилазы зерна некоторых злаковых. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1980. Т. 12, № 3. С. 258–262.
13. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2018. Kyiv, 2018. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reistry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy> (Last accessed: 23.02.2018). [in Ukrainian] / Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні на 2018 рік. К., 2018. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reistry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy> (дата звернення: 23.02.2018).
14. Netsvetaev V.P., Bondarenko L.S., Motrin I.P. Polymorphism of alpha-amylase of soft wheat and the conjugacy of zymotypes of the enzyme with quantitative signs of plants. *Cytology and genetics*. 2015. Vol. 49, № 6. P. 21–29. [in Russian] / Нецветаев В.П., Бондаренко Л.С., Моторина И.П. Полиморфизм альфа-амилаз мягкой пшеницы и сопряженность зимотипов фермента с количественными признаками растений. *Цитология и генетика*. 2015. Т. 49, № 6. С. 21–29.
15. Davis B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins *Ann. N. J. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121, № 2. P. 404–427.
16. Perten H. Application of the Falling Number method for evaluating alpha-amylase activity. *Cereal chemistry*. 1964. Vol. 41. P. 127–140.

**RADCHENKO O. M., SANDETSKA N. V., DYKUN M. O., SIRANT L. V.**

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasykivska str., 31/17, e-mail: ales2009@ukr.net*

## IZOZYME POLYMORPHISM OF ALPHA-AMYLASE IN SOFT WHEAT

**Aim.** Study of alpha amylase polymorphism in winter wheat varieties. **Methods.** Isoenzymes of alpha-amylase were detected by electrophoretic protein separation in a polyacrylamide gel. The fall number on the Falling Number 1700 was determined. **Results.** Strains from various collections were explored: Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Odesa and german strains. The polymorphism of wheat grain alpha-amylase was detected by the method of electrophoretic protein separation. We searched associations between variants of alpha-amylase and resistance to pre-harvest germination, the falling number in the examined samples was determined. **Conclusions.** The frequency of the prevalence of variants for isoenzymes of alpha-amylase in soft wheat varieties was estimated. It was shown that genotypes containing the variant of the isoenzymes AbC are more resistant to pre-harvest germination. Among the studied varieties of PBGI NAAS and IPPG NAS of Ukraine, the variant of alpha-amylase AbC.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, isoenzymes, soft wheat, electrophoresis, falling number.